

果蝇免疫研究进展及其感染分枝杆菌的免疫特征

蒋德梅, 谢建平*

(西南大学生命科学学院现代生物医药研究所, 重庆 400715)

摘要: 耐药性、持续感染以及与 HIV 病毒的共感染等诸多因素导致一度得到控制的结核病死灰复燃, 有效控制日益严峻的结核病迫切需要深入认识其致病菌——结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* 的基础生物学特性, 以及宿主相应的免疫控制机理。目前尚无一个动物模型能够同时回答这些关键问题, 而利用多种动物模型有望从不同角度回答上述问题, 普遍认为果蝇 *Drosophila* 是比较理想的研究结核病天然免疫的简易模式动物之一。本文综述了果蝇免疫研究的最新进展, 包括免疫途径及其新成员与负调控子, 重点总结了用海分枝杆菌 *M. marinum*、偶发分枝杆菌 *M. fortuitum* 和耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* 等分枝杆菌感染果蝇的新发现, 其中包括感染期间不诱导抗菌肽表达, 多个宿主因子(如 CD36 家族成员和 ESCRT)参与了应答, 鉴定出具有杀灭分枝杆菌作用的 β -己糖酰胺酶, 感染期间能量代谢相关基因差异表达等。这些工作为利用果蝇模型快速筛选治疗结核病的新药物靶标和药物先导物提供了思路。

关键词: 果蝇; 免疫; 结核病; 分枝杆菌; 细菌感染

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2009)10-1163-08

Immune research progress in *Drosophila* with emphasis on their immune characteristics infected by *Mycobacterium*

JIANG De-Mei, XIE Jian-Ping* (Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Tuberculosis reestablishes as a predominant threat to human beings. Several factors including multidrug resistance, persistence and co-infection with HIV contributed to its rampancy. More sophisticated understanding of the basic biology of its pathogen, *Mycobacterium tuberculosis* and the immune response of human beings will be the cornerstone of tuberculosis control and eradication. No single animal model can fully address the magnitudes of its pathogenesis. Integrating knowledge from diverse animal models can be insightful. *Drosophila* is ideal to address the innate immune response to tuberculosis. Immune response pathway, components of immune response pathway and related negative regulatory factors in *Drosophila* were reviewed. The major findings employing *Mycobacterium* infection, especially *M. marinum*, *M. fortuitum* and *M. smegmatis* to challenge *Drosophila* were summarized. Copious studies demonstrated that no antimicrobial peptides were significantly induced, and multiple host factors such as CD36 family member and ESCRT were involved in the host response. Beta-hexosaminidase related to killing *Mycobacterium* was identified. Energy metabolism related genes were differentially regulated during infection. These might be helpful to the identification of novel anti-tuberculosis drug targets and lead discovery via the facile *Drosophila* model.

Key words: *Drosophila*; immune; tuberculosis; *Mycobacterium*; bacterial infection

据 WHO 统计, 全世界每年新增结核病患者约 800 万人, 约 300 万人死于结核病, 而且耐药结核病的比例呈上升趋势(Espinal *et al.*, 2001; Aslan *et al.*, 2008)。控制结核病需要新措施, 恰当的动物模型是

开发结核病控制新措施的重要工具。哺乳动物的繁殖缓慢、个体大、巨大的双倍体基因组、伦理和经费等限制了其应用。结核病的致病菌——结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* (简称结核菌)是空气传播

基金项目: 病毒性肝炎艾滋病等国家重要传染病科技重大专项(2008ZX10003-006)

作者简介: 蒋德梅, 女, 1975 年生, 重庆人, 博士研究生, 专业细胞生物学, 研究方向为重要致病菌的细胞信号转导和药物靶标, E-mail: maryfeng@swu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: jianpingxie@yahoo.com

收稿日期 Received: 2009-04-02; 接受日期 Accepted: 2009-09-03

的病原。基于生物安全方面的考虑,非结核分枝杆菌以及对其感染的部位免疫应答特征接近人体的其他动物模型是研究结核菌-人体相互作用的良好替代品。目前比较公认的模型包括:斑马鱼 *Danio rerio* (Swaim *et al.*, 2006)、九带犰狳 *Dasypus novemcinctus* (Scollard *et al.*, 1996)、小鼠 *Mus musculus* (Zhu *et al.*, 2005; Parti *et al.*, 2008) 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Dionne *et al.*, 2003; Philips *et al.*, 2005, 2008) 等。上述模型分别能揭示结核菌感染免疫中某一方面的机制,但都不完美。因此,多种模型研究获得的资料相互补充,可能深化对结核菌免疫应答机制的认识。由于果蝇和人的天然免疫系统都比较保守,因此应用果蝇模型具有一定的优势,尤其适合揭示结核菌感染免疫的天然免疫特征。本文主要介绍近年来果蝇免疫研究的进展和果蝇-分枝杆菌相互作用研究的成果和未来的研究方向。

1 果蝇是日渐被青睐的感染免疫研究的动物模型

果蝇是经典遗传学研究的理想模式动物。果蝇在遗传学基础理论的建立、发育调控、神经系统疾病(如帕金森氏病、老年痴呆症、药物成瘾和酒精中毒)、衰老与长寿、学习记忆和认知行为的研究等方面发挥了重要作用。此外,果蝇也是研究感染免疫的新秀。其优势可以概括为:代时短、易培养、成本低,拥有类似于脊椎动物的吞噬细胞和先天性免疫信号途径(Toll 和 Imd 途径),容易操作(www.fruitfly.org/expression/immunity)(De Gregorio *et al.*, 2002),遗传研究工具齐全,全基因组序列已知(Adams *et al.*, 2000; Hoskins *et al.*, 2007),易于进行正向遗传学和反向遗传学分析,初筛毒力因子供在哺乳动物中验证,适合进行药物先导物的高通量筛选等。因此,果蝇作为感染免疫的动物模型,特别是分枝杆菌感染免疫的动物模型,日益受到青睐。

2 果蝇免疫应答的信号途径

以果蝇为模式的昆虫免疫学研究起步虽晚,但进展颇大(Hoffmann and Reichhart, 2002; Hoffmann, 2003)。与哺乳动物相比,果蝇中没有类似 T、B 淋巴细胞等构成的获得性免疫系统,先天免疫系统是其唯一的防御体系。果蝇免疫应答主要包括以下 3 个方面:体液免疫产生抗微生物蛋白、细胞免疫吞噬外源微生物和酚氧化酶反应在伤口或异

物周围堆集黑色素(Brennan and Anderson, 2004)。受到微生物(革兰氏阳性菌 G^+ 、真菌和革兰氏阴性菌 G^-)攻击时,果蝇能有效地激活 Toll 和 Imd 信号途径。这两个信号途径与哺乳动物先天免疫防御的 TLR 和 TNFR 信号途径较相似,都能激活下游的 NF- κ B 样转录因子,调控免疫相关基因的转录(Silverman and Maniatis, 2001; Tanji *et al.*, 2007)。

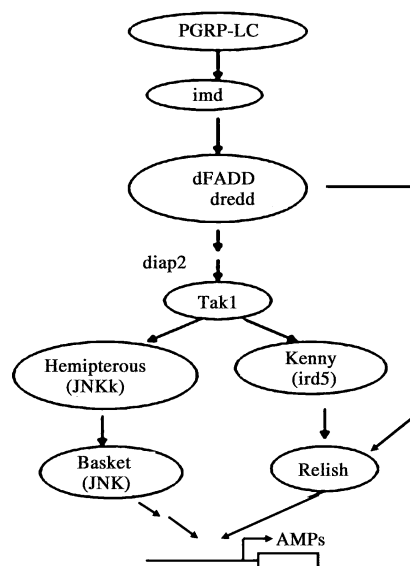


图1 基于体内遗传上位分析的 Imd 信号模式

Fig. 1 Model of Imd signaling based on genetic epistasis data *in vivo* 图引自 Leulier 等 (2006)。Imd 信号转导途径在 Tak1 水平上分开了,这是 NF- κ B 信号分支和 JNK 信号分支所必需的,脂肪体细胞里抗微生物肽的表达需要这两个信号。箭头表示依赖于体内 Imd 途径各个组分的过表达的遗传相互作用。The figure was adapted from Leulier *et al.* (2006). The Imd signal transduction pathway bifurcates at the level of Tak1, which is required for the activation of the NF- κ B signaling branch as well as the JNK signaling branch, both of which are necessary for expression of antibacterial peptide genes in the fat body. Arrows indicate genetic interactions that rely on overexpression of individual components of the Imd pathway *in vivo*.

目前在果蝇的基因组中发现 9 个 Toll 样基因 (*Toll-1* - 9, 其中 *Tol-2* 又名 *18-wheeler*) (Levashina *et al.*, 1998), 其中, *Toll-2* 与细菌的免疫应答有关, *Toll-1* 和 *Toll-5* 与激活抗菌肽基因的表达有关。TOLL 蛋白属于 I 型跨膜受体,当 TOLL 胞外区域与活化的 TOLL 配体 SPZ 结合后,其胞内区域 TIR 能够激活 Tube, Pelle 及其他分子,经过信号级联激活 Rel 家族的转录,最终激活相关免疫基因的表达。*imd* 基因编码一个死亡结构域蛋白 (death domain protein)。该蛋白的作用与 TNR 受体信号途径中调节上皮组织中抗菌肽基因的蛋白作用类似。Imd 途径通过激活 Rel/(NF)- κ B 样转录因子来调

节上皮组织中抗菌肽基因的表达和参与细胞凋亡 (Lavine and Strand 2002; Kurata, 2004)。已发现 6 个参与 Imd 途径的成分: Imd, dTAK1, Ird5, Kenny, Dredd caspase 和 Relish 因子 (Engstrom, 1999)。NF- κ B 转录因子涉及到进化上保守的信号途径, 包括凋亡、免疫和炎症反应等多种细胞过程 (Kleino *et al.*, 2008)。凋亡抑制蛋白家族是最先确定的凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 的成员, IAP 是影响多种生物过程的多功能信号体。用遗传上位分析把 *Drosophila* inhibitor of apoptosis2 (diap2) 放在 imd, Dredd, Tak1 和 Relish 的

不同位置, 研究了黑腹果蝇体内 IAP2 的功能 (Leulier *et al.*, 2006)。diap2 突变的果蝇发育正常, 有完全的生活力, 这提示 diap2 对果蝇的正常发育并非必要。然而, 这些果蝇对 G^- 菌的感染特别敏感。因为果蝇感染 G^- 菌会启动 Imd 免疫途径, 该途径又依赖于 NF- κ B 路径, 而 NF- κ B 的路径与哺乳动物肿瘤坏死因子受体 1 (tumour necrosis factor receptor, TNFR1) 路径有一定的相似性。diap2 突变的果蝇不能激活 NF- κ B 介导的抗菌肽基因的表达, 结果快速被细菌感染, 这表明 DIAP2 是 Imd 信号级联的一个很重要的成分 (图 1), 帮助生物体控制细菌感染。

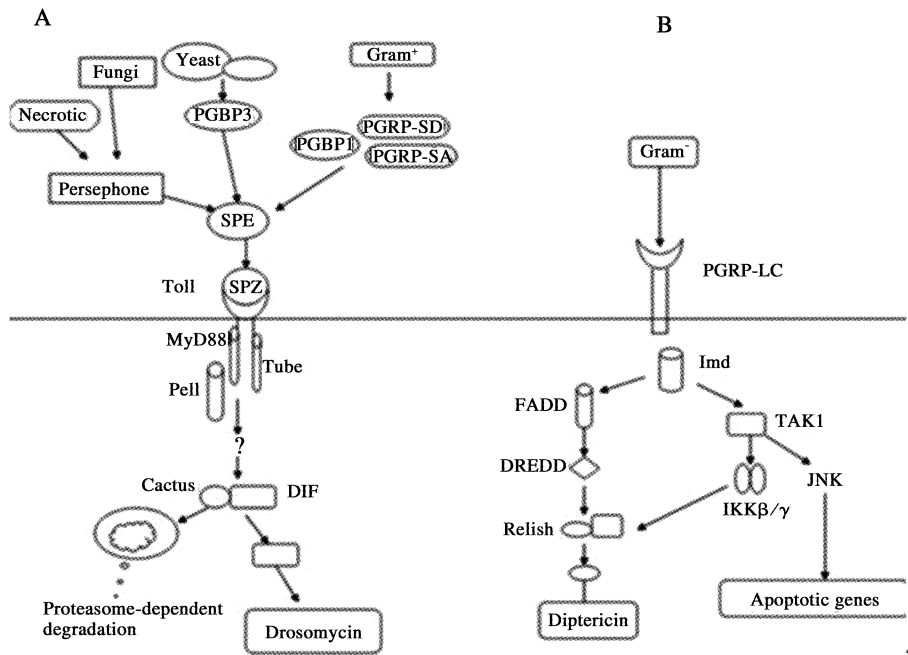


图 2 果蝇控制系统性病原感染的分子信号传导系统

Fig. 2 Molecular cascades controlling the systemic antimicrobial response of *Drosophila*

图引自 Royet 等 (2005)。A: 真菌和 G^+ 菌感染激活 Toll 途径。 G^+ 感染期间, 该通路的上游的激活需要肽聚糖识别蛋白 PGRP-SA (通常也有 PGRP-SD), 同时, 也需要 G^- 菌结合蛋白 (单体 PGBP-1)。在真菌感染期间, 蛋白水解级联的激活能引起丝氨酸蛋白酶 Persephone (PSH) 的循环, 通常是由丝氨酸蛋白酶抑制子 necrotic (NEC) 来控制的。Toll 的激活是通过结合到细胞因子 Spaetzle 的一个分裂体 (SPZ) 来实现的。激活的 Toll 通过受体-接头分子复合物 (MyD88, Tube 和激酶 Pelle) 传递, 最终引起 Cactus 磷酸化 (随后在蛋白酶体中降解) 和 NF- κ B 家族成员 DIF 的解离。B: 在 G^- 菌感染时 (主要是, 但不是唯一的), 通过跨膜受体 PGRP-LC 以未知的机制来激活 Imd 途径感知致病菌, 这发生在免疫反应细胞的细胞膜上。imd 基因下游的 MAP3 激酶 TAK1 能作为 IKK-激酶或 JNK 激酶而引起不同的反应。激活的 IKK 与该进程中的 caspase-8 同源物相互作用, 解离 NF- κ B 家族成员 Relish, 诱导抗菌肽基因的表达, JNK 的激活控制编码细胞骨架蛋白和凋亡蛋白前体的基因的表达。The figure was adapted from Royet *et al.* (2005). A: The Toll pathway is essentially triggered during infection by fungi and Gram-positive bacteria. Upstream activation of this cascade during Gram-positive infection requires the presence of peptidoglycan-recognition protein PGRP-SA (and frequently PGRP-SD), concomitantly, with Gram-negative bacteria binding protein. Toll activation is through binding to a cleaved form of the cytokine Spaetzle (SPZ). Activation of a proteolytic cascade during fungal infection can involve the circulating serine protease Persephone (PSH) normally kept in check by the serine protease inhibitor necrotic (NEC). Activated Toll conveys its signaling function via a receptor-adaptor complex (MyD88, Tube and the kinase Pelle) culminating in the phosphorylation (and subsequent degradation in the proteasome) of Cactus and the dissociation of the NF- κ B family member DIF; B: During Gram-negative bacterial infection (predominantly, but not solely), microbial sensing occurs at the membrane of immune-responsive cells by the transmembrane receptor PGRP-LC leading to activation of the Imd pathway by an unknown mechanism. Downstream of the imd gene, the MAP3 kinase TAK1 can act as a IKK-kinase or a JNK kinase with different outcomes. Whereas activated IKK interact with the caspase-8 homologue in the process leading to the cleavage of the NF- κ B family member Relish, and subsequent expression of antimicrobial peptide genes, JNK activation controls expression of genes encoding cytoskeletal proteins and proapoptotic proteins.

尽管果蝇缺乏干扰素,但有 JAK(Janus kinase)信号转导子和影响免疫的 STAT(signal transducer and activator of transcription)信号路径的激活子,果蝇幼虫期血细胞的增值和分化受 JAK 和 STAT(Agaisse *et al.*, 2003; Royet *et al.*, 2005)两个信号途径的调控,果蝇 C 病毒(*Drosophila C virus*, DCV)确证该通路对于成年果蝇感染存活很重要(Dostert *et al.*, 2005)。JAK/STAT 信号路径突变后,果蝇更容易感染病毒致死。果蝇的免疫信号途径的简略表述见图 2。

德国癌症研究中心的 Goto 等(2008)用全基因组范围 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)发现了

一个新的分子 Akirin,他们证实该分子可激发果蝇、小鼠,甚至人类的天然免疫反应。当抑制果蝇免疫细胞中 Akirin 的合成时,果蝇就更易感染细菌。若将果蝇全身细胞的 Akirin 都缺失,果蝇幼虫就会在早期死去。日本学者研究了小鼠中的 Akirin 蛋白,发现该蛋白在小鼠中和在果蝇和人体中的作用一致。NF- κ B 信号途径在炎症反应中起着重要作用,而炎症与癌症的发生又有着密切的联系,所以控制该信号途径的小分子可能有助于调控免疫应答,减少癌症的发生。德国亥姆霍兹国家研究中心的研究人员提出了 Akirin 免疫作用模式(图 3)。

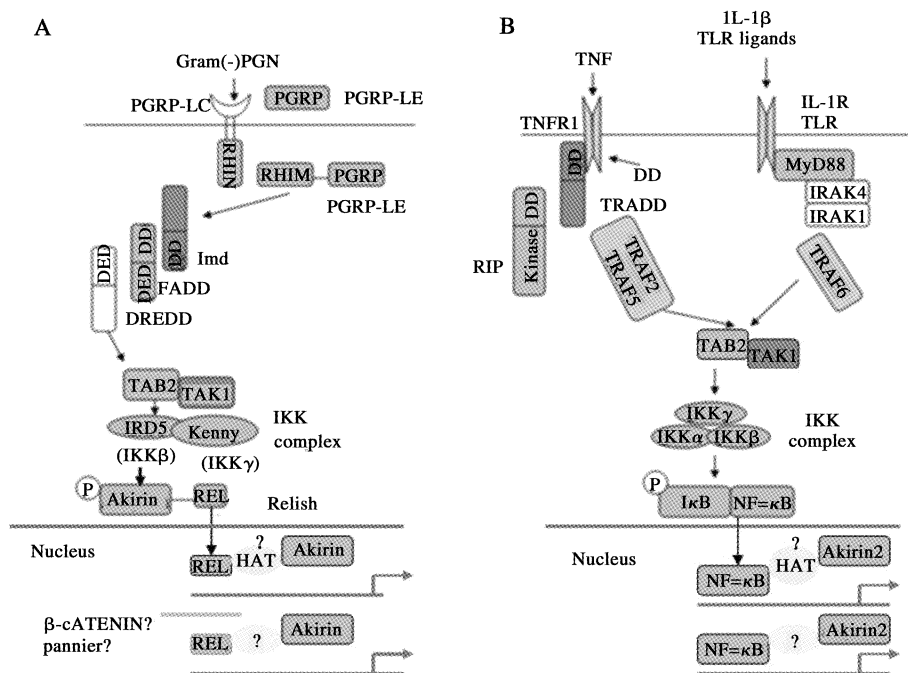


图 3 Akirin 和 Akirin 2 的作用模式

Fig. 3 Model for Akirin and Akirin2 function

图引自 Goto 等(2008)。A: 黑腹果蝇中 Akirin 的作用模式; B: 小鼠中 Akirin2 的作用模式。果蝇只有一个编码核蛋白的 *Akirins* 基因, 脊椎动物(鸟类以外)含有 *Akirins* 基因的两个拷贝(*Akirin1* 和 *Akirin2*)。Akirin2 的功能类似于 Akirin, Akirin1 和 Akirin2 的功能可能冗余。果蝇中 *Akirins* 是 Imd 途径里转录因子 Relish 水平的下游所必需的, 能在核内与细胞骨架蛋白 β -catenin 和参与心脏及血细胞发育的 GATA(属于锌指蛋白转录因子, 含有两个锌指结构, 是直接和(T/A)GATA(A/G)序列结合的高保守的 DNA 结合域)因子 pannier 相互作用; 小鼠中 *Akirins2* 是 TLR, TNF 和 IL-1 β 下游信号所必需的。The figure was adapted from Goto *et al.* (2008). A: Model for Akirin function in *Drosophila*; B: Model for Akirin2 function in mouse. *Drosophila* has only one *Akirin* gene encoding a nuclear protein, the vertebrate genomes except for that of birds contain two copies (*Akirin1* and *Akirin2*) of the *Akirin* gene. The function of *Akirin2* is similar to *Akirin*, maybe that of *Akirin1* and *Akirin2* is redundant. *Akirins* is necessary to the downstream of transcription factor Relish in IMD in *Drosophila* and in nucleus it can interact with cytoskeleton protein β -catenin and GATA involved in the development of heart and hematocyte. *Akirin2* is necessary to the downstream of TLR, TNF and IL-1 β in mouse.

3 果蝇免疫应答信号途径的新负调控因子

Wnt inhibitor of Dorsal (WntD)是调节果蝇感染免疫 Toll 信号途径的一个负调控子(Ganguly *et al.*,

2005; Gordon *et al.*, 2005)。WntD 是果蝇胚胎模式形成和先天性免疫反应中 NF- κ B 同源基因 *dorsal* 的一个反馈抑制子, WntD 的表达受 Toll-Dorsal 信号的控制, 增加 WntD 的水平会抑制背核的聚集。通过基因敲除实验表明, 失去 WntD 功能的突变体有

免疫缺陷, 其 Toll-Dorsal 信号上升。*pirk* 是 Imd 途径的负调节子, 在果蝇体内外都能被 G^- 菌感染所高度诱导, RNAi 介导的 *pirk* 表达下调能使感染 G^- 的果蝇的 Imd 途径过度活跃; 反之, 过表达 *Pirk* 能减弱体内的 Imd 路径反应 (Kleino *et al.*, 2008)。肿瘤坏死因子 (tumour necrosis factor, TNF) 家族在人类的感染中起着重要作用, 果蝇只有一个该家族的成员 *eiger*, 其作用如同 TNF 在人类中一样。当感染胞外致病菌时, *eiger* 突变的果蝇都会比野生型果蝇存活率更低 (Brandt *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2007); 但当感染胞内菌时, *eiger* 突变果蝇存活率上升或微生物载量没有变化, 这表明果蝇对胞内致病菌有一个耐受效应 (Schneider *et al.*, 2007)。和野生型相比, *eiger* 突变体中 diptericin 的转录增加, 而 diptericin 是一个作为 IMD 信号代表的典型的抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs), 这提示 *eiger* 可能是 IMD 信号的一个负调控子。这些负调控子在果蝇免疫路径中的作用提示它们在哺乳动物中的同源物或类似物可能对免疫反应有相似的作用, 更有价值的信息尚待深入研究。

4 果蝇对分枝杆菌感染的免疫应答特征

随着结核病的死灰复燃和对果蝇感染免疫研究的深入, 分枝杆菌感染果蝇的研究备受关注。这方面的基石是选择能够感染果蝇而且感染免疫应答特征类似人体的分枝杆菌。致病性分枝杆菌较多, 如结核分枝杆菌 *M. tuberculosis*、麻风分枝杆菌 *M. leprae*、鸟分枝杆菌 *M. avium*、海分枝杆菌 *M. marinum*、偶发分枝杆菌 *M. fortuitum* 等, 但能自然感染果蝇的分枝杆菌却不多。目前用于果蝇感染免疫研究的只有海分枝杆菌 (Dionne *et al.*, 2003, 2006)、偶发分枝杆菌和耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* (Agaisse *et al.*, 2005; Philips *et al.*, 2005, 2008)。

4.1 抗菌肽的表达研究

果蝇先天性免疫的最佳方式是循环的抗菌肽的产生, 这些肽能被果蝇的 3 个 Rel 相关转录因子 *dif*, *dorsal* 和 *relish* 中的任意一个激活而快速产生 (感染后几个小时)。当用启动子-GFP 标记了的单核李斯特菌 *Listeria monocytogenes*、伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*、*M. marinum* 和 *M. smegmatis* 等感染果蝇, 检测 metchnikowin, drosocin, attacin A, cecropin A1 和 diptericin 等抗菌肽的表达情况 (Dionne *et al.*, 2003), 研究发现 *L.*

monocytogenes, *S. typhimurium* 均能诱导 AMPs 的表达, 但 *M. marinum* 和 *M. smegmatis* 却不能。而且, 野生型果蝇比这两条路径突变的果蝇对 *M. marinum* 的感染更敏感。*M. marinum* 和 *M. smegmatis* 不能激活这两条路径, 可能是果蝇不能把分枝杆菌识别为侵入者, 也可能是一些细菌组分阻碍了 Rel 的活性。在脊椎动物里, Rel 信号有抗凋亡的效应, 巨噬细胞的凋亡对结核分枝杆菌的免疫有重要作用, 已有证据表明人为诱导自体吞噬能增强对结核菌的杀灭作用 (Deretic, 2008)。不能诱导 AMPs 的产生可能是果蝇里某些抵抗细胞凋亡的因子引起的, 通过减少巨噬细胞的凋亡来帮助结核菌在巨噬细胞中的存活和进一步的感染, 但具体原因不清楚。

4.2 宿主因子

用 *M. smegmatis* mc2-155 和 *M. fortuitum* EJRI54 感染果蝇 S2 细胞系模型, 主要通过 RNAi, 高通量筛选 (high throughput screening, HTS)、蛋白质分析和免疫荧光检测等方法, 建立了一种系统的确定结核杆菌的摄入和生长所必须因子的功能基因组筛选模式。这些研究发现: (1) CD36 家族的成员 (Philips *et al.*, 2005); (2) 调整哺乳动物细胞里细菌吞噬体的成熟的转运必需的内吞体分选复合物 (endosome sorting complex necessary for transfer, ESCRT) (Philips *et al.*, 2008); (3) 溶酶体酶 β -己糖酰胺酶 (Koo *et al.*, 2008) 等是控制分枝杆菌感染的重要因子。

在全基因组水平用 RNAi 在果蝇巨噬细胞样细胞里寻找普通的噬菌作用所必须的因子和分枝杆菌感染所必需的特殊因子。发现 CD36 家族的一个成员 Peste (Pes), 是摄入分枝杆菌所必需的, 但并非摄入大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 所必需。几乎所有影响偶发分枝杆菌的肌动蛋白骨架组分的因素对于普通的噬菌作用都是必要的, 包括 cdc42、Arp2/3 复合体、肌动蛋白成帽蛋白和抑制蛋白 profilin, 所有的分子都参与了噬菌作用过程。一些宿主因子对于普通的细菌的摄入是不必要的, 但对于 *M. fortuitum* 的感染却是必要的, 比如空泡腺苷三磷酸酶、染色质因子和许多功能未知的分子。果蝇里有 10 多个 B 族清道夫受体 (scavenger receptors, SRs), 在人和老鼠里有 4 个——CD36, SR-BI, 以及 SR-BI 的剪切亚型 SR-BII 和 LIMP-II。用 *M. fortuitum* 检测了这些分子介导感染的能力, 发现在 HEK293 细胞中转染时, 人

的 SR-BI 和 SR-BII (Mulcahy *et al.*, 2004) 比 Pes 引起的感染程度更高, 而老鼠 CD36 的表达引起感染程度较低。目前对 SR-BI 和 SR-BII 在巨噬细胞里的作用研究较少, 具体机制还有待研究。通常认为这些受体对宿主抵抗 *M. fortuitum*, *E. Coli* 和 *S. Aureus* 等多种细菌感染中都起着重要的作用, 在结核菌的生长和摄取中也很重要。岩藻多糖是 A 族 SRs 和 SR-BI 的非特异性抑制剂 (Husemann *et al.*, 2001), 它能干扰单核细胞起源的巨噬细胞里 *M. tuberculosis* 的结合和摄入 (Zimmerli *et al.*, 1996)。

ESCRT 结构在多泡体形成和受体下调过程中起关键作用, 该蛋白质在从酵母到人类的生物体中均比较保守, 它可能是把细菌运输到溶酶体所必需的。在缺乏 ESCRT 活性的细胞里, 细菌也许同样能被运输到溶酶体, 但溶酶体的组分也许没能正确区域化, 所以其环境更能容许细菌生长。已有证据表明泛素是溶酶体的一个杀菌组分 (Alonso *et al.*, 2007), 在 ESCRT 功能缺乏时, 它进入多泡体 (multivesicular bodies, MVBs), 释放进入到溶酶体的可能性就更小。所以, 随着泛素在 ESCRT 衰竭的细胞里被异常地捕获到内体区域, 自由的泛素池就减少, 而它能影响细菌感染的很多细胞进程。把人对麻风病的敏感性位点定位到一个 E3 泛素蛋白连接酶 parkin 的研究结果暗示了泛素在分枝杆菌感染中的重要作用 (Mira *et al.*, 2004)。通过电子显微镜检测了在 S2 细胞里耻垢分枝杆菌的胞内定位, 发现了肿瘤易感基因 *Tsg101* 的衰竭。分枝杆菌的感染涉及到许多功能和 ESCRT 有关的宿主因子。改变 ESCRT 相关宿主因子的活性都足以使非致病菌分枝杆菌种类如 *M. smegmatis* 在细胞内生长, 这提示致病菌能利用宿主细胞的一些易感点来提高毒力分枝杆菌或其他空泡致病菌靶向 ESCRT 结构的能力, 并进而增大存活和生长的可能性。尽管靶向 ESCRT 结构的细菌还不清楚, 但大多数包膜病毒会破坏 ESCRT 的功能 (Morita and Sundquist, 2004)。例如, HIV-1 的 Gag 结合 Tsg101, 通过阻碍 ESCRT 的活性来使病毒发芽, 而病毒出芽过程在拓扑学上与 MVBs 的形成过程相同。因为病毒的 Gag 能破坏 ESCRT 的活性 (Valiathan and Resh, 2004), 推测在共感染的细胞里 HIV 对 ESCRT 的效应可能有助于增强感染 HIV 的个体对结核杆菌和条件致病菌 (如鸟分枝杆菌 *M. magerit*) 的敏感性。

β -己糖酰胺酶是一种典型的肽聚糖水解酶, 能够破坏溶解细菌细胞壁中的肽聚糖成分, 从而使细

菌的细胞壁破损, 引起细胞崩解。用 *M. marinum* 感染果蝇 S2 细胞, 在约 1 000 个 RNAi 缺失掉的宿主基因里均发现溶酶体酶 β -己糖酰胺酶在哺乳动物感染期间能限制分枝杆菌的生长。但他们发现 β -己糖酰胺酶限制分枝杆菌生长的作用发生在感染的早期, 启动适应性免疫之前, 在巨噬细胞质膜处有着明显杀菌作用。一旦巨噬细胞被活化后, 在野生型和 β -己糖酰胺酶缺陷型的细胞之间, 限制分枝杆菌生长的差异就不明显了。

4.3 参与免疫应答的能量代谢相关基因

用组织学方法来检测 *M. marinum* 引起的果蝇病, 患病果蝇都表现出严重的组织损伤和细胞病理学特征。与健康的脂肪体细胞相比, 感染果蝇的许多脂肪体细胞都不正常, 出现许多大空泡。感染果蝇逐渐失去了以脂肪和糖原形式存在的代谢存储而变得高血糖。用寡聚核苷酸芯片分析检测 *M. marinum* 感染果蝇时宿主基因受影响的情况, 发现 *M. marinum* 感染会引起普遍的能量储存相关基因表达的变化 (Dionne *et al.*, 2006)。*foxo* 是编码果蝇唯一的 O 类叉头框 forkhead box (Fox) 转录因子家族的成员。在老鼠里, *foxo* 是胰岛素丧失状态的重要的效应因子, 对高血糖症和糖尿病的肝糖异生缺陷有一定作用 (Altomonte *et al.*, 2003; Puigserver *et al.*, 2003)。*foxo* 的活性受胰岛素效应激酶 Akt 的抑制, *M. marinum* 的感染引起 Akt 的活性降低, 它对 *foxo* 的抑制作用减弱, 从而使感染果蝇的 *foxo* 的活性增加, 能量消耗增强; 相反, *foxo* 突变体的能量消耗则减弱。强迫诱导果蝇的胰岛素信号途径能使果蝇的寿命延长, 这和人类的情形相似, 病人刚感染病菌时, 如果胰岛素水平得到很好的控制, 则他们承受感染性休克的症状就减轻 (van den Berghe *et al.*, 2001)。这些表明, 果蝇不仅适于感染的先天性免疫研究, 而且也可用于探索感染的生理反应过程。

5 小结与展望

虽然果蝇的感染免疫研究起步较晚, 但成绩斐然。随着研究的深入, 发现了免疫路径中更多的新分子和新的负调控子。随着对免疫路径认识的不断丰富, 我们可以从中获得更多控制结核病的启示。而用分支杆菌感染果蝇发现所用分支杆菌不能诱导抗菌肽的表达; 感染过程要依赖诸如 CD36 家族成员、ESCRT 等一些宿主因子; 启动适应性免疫前,

β -己糖酰胺酶起着重要的杀菌作用; 分枝杆菌感染诱导能量代谢相关基因表达, 从而影响宿主的生理等方面。

相信随着 RNAi 技术、高通量筛选 (HTS) 和基因芯片的发展, 可望发现更多的尤其是进化上保守的与分枝杆菌感染相关的宿主因子。这些都将丰富我们对果蝇的免疫特征的认识, 同时也将对人体结核菌感染免疫应答提供更多的启发。转基因果蝇模型将普遍的用于检测细菌效应蛋白的体内功能, 并通过其功能来进一步确定宿主基因 (Botham *et al.*, 2008)。分离新近发现的果蝇信号途径中哺乳动物的同源物来解析相应的哺乳动物的信号途径, 使得利用这些因子及其同源物筛选新的抗结核药物靶标和结核菌感染的抑制剂成为可能, 从而为开发治疗结核病的新措施提供基础。

参 考 文 献 (References)

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA *et al.*, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461): 2185–2195.
- Agaisse H, Burrack LS, Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N, Higgins DE, 2005. Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science*, 309(5738): 1248–1251.
- Agaisse H, Petersen UM, Boutros M, Mathey-Prevot B, Perrimon N, 2003. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell*, 5(3): 441–450.
- Alonso S, Pethe K, Russell DG, Purdy GE, 2007. Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(14): 6031–6036.
- Altomonte J, Richter A, Harbaran S, Suriawinata J, Nakae J, Thung SN, Meseck M, Accili D, Dong H, 2003. Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285(4): 718–728.
- Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Emekdas G, 2008. Genotypic analysis of isoniazid and rifampin resistance in drug-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in southern Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 61(4): 255–260.
- Botham CM, Wandler AM, Guillemin K, 2008. A transgenic *Drosophila* model demonstrates that the *Helicobacter pylori* CagA protein functions as a eukaryotic Gab adaptor. *PLoS Pathog.*, 4(5): 1–7.
- Brandt SM, Dionne MS, Khush RS, Pham LN, Vigdal TJ, Schneider DS, 2004. Secreted bacterial effectors and host-produced eiger/TNF drive death in a *Salmonella*-infected fruit fly. *PLoS Biol.*, 2(12): 2067–2075.
- Brennan CA, Anderson KV, 2004. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu. Rev. Immunol.*, 22: 457–483.
- De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B, 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.*, 21(11): 2568–2579.
- Deretic V, 2008. Autophagy, an immunologic magic bullet: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block and how to bypass it. *Future Microbiol.*, 3: 517–524.
- Dionne MS, Gori N, Schneider DS, 2003. *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect. Immun.*, 71(6): 3540–3550.
- Dionne MS, Pham LN, Shirasu-Hiza M, Schneider DS, 2006. Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 16(20): 1977–1985.
- Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C, Hoffmann JA, Imler JL, 2005. The Jak-stat signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat. Immunol.*, 6(9): 946–953.
- Engstrom Y, 1999. Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.*, 23(4–5): 345–358.
- Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, Hoffner S, Rieder HL, Binkin N, Dye C, Williams R, Raviglione MC, 2001. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N. Engl. J. Med.*, 344(17): 1294–1303.
- Ganguly A, Jiang J, Ip YT, 2005. *Drosophila* WntD is a target and an inhibitor of the Dorsal/Twist/Snail network in the gastrulating embryo. *Development*, 132(15): 3419–3429.
- Gordon MD, Dionne MS, Schneider DS, Nusse R, 2005. WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF-kappaB in *Drosophila* development and immunity. *Nature*, 437(7059): 746–749.
- Goto A, Matsushita K, Gesellchen V, El Chamy L, Kutenkeuler D, Takeuchi O, Hoffmann JA, Akira S, Boutros M, Reichhart JM, 2008. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in *Drosophila* and mice. *Nat. Immunol.*, 9(1): 97–104.
- Hoffmann JA, 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426(6962): 33–38.
- Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*, 3(2): 121–126.
- Hoskins RA, Carlson JW, Kennedy C, Acevedo D, Evans-Holm M, Frise E, Wan KH, Park S, Mendez-Lago M, Rossi F, Villasante A, Dimitri P, Karpen GH, Celniker SE, 2007. Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science*, 316(5831): 1625–1628.
- Husemann J, Loike JD, Kodama T, Silverstein SC, 2001. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine microglia to fibrillar beta-amyloid. *J. Neuroimmunol.*, 114(1–2): 142–150.
- Kleino A, Myllymaki H, Kallio J, Vanha-aho LM, Oksanen K, Ulvila J, Hultmark D, Valanne S, Ramet M, 2008. Pirk is a negative regulator of the *Drosophila* Imd pathway. *J. Immunol.*, 180(8): 5413–5422.

- Koo IC, Ohol YM, Wu P, Morisaki JH, Cox JS, Brown EJ, 2008. Role for lysosomal enzyme beta-hexosaminidase in the control of mycobacteria infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(2): 710–715.
- Kurata S, 2004. Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by peptidoglycan recognition protein (PGRP)-family members in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.*, 28(2): 89–95.
- Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10): 1 295–1 309.
- Leulier F, Lhocine N, Lemaitre B, Meier P, 2006. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection. *J. Mol. Cell. Biol.*, 26(21): 7 821–7 831.
- Levashina EA, Ohresser S, Lemaitre B, Imler JL, 1998. Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide metchnikowin. *J. Mol. Biol.*, 278(3): 515–527.
- Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, Mai CP, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, Samo EN, Alter A, Montpetit A, Moraes ME, Moraes JR, Dore C, Gallant CJ, Lepage P, Verner A, Van De Vosse E, Hudson TJ, Abel L, Schurr E, 2004. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*, 427 (6 975): 636–640.
- Morita E, Sundquist WI, 2004. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20: 395–425.
- Mulcahy JV, Riddell DR, Owen JS, 2004. Human scavenger receptor class B type II (SR-BII) and cellular cholesterol efflux. *Biochem.*, 377: 741–747.
- Parti RP, Shrivastava R, Srivastava S, Subramanian AR, Roy R, Srivastava BS, Srivastava R, 2008. A transposon insertion mutant of *Mycobacterium fortuitum* attenuated in virulence and persistence in a murine infection model that is complemented by Rv3291c of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb. Pathog.*, 45 (5–6): 370–376.
- Philips JA, Porto MC, Wang H, Rubin EJ, Perrimon N, 2008. ESCRT factors restrict mycobacterial growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(8): 3 070–3 075.
- Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N, 2005. *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science*, 309(5 738): 1 251–1 253.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Acceli D, Spiegelman BM, 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*, 423(6 939): 550–555.
- Royet J, Reichhart JM, Hoffmann JA, 2005. Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.*, 17(1): 11–17.
- Schneider DS, Ayres JS, Brandt SM, Costa A, Dionne MS, Gordon MD, Mabery EM, Moule MG, Pham LN, Shirasu-Hiza MM, 2007. *Drosophila eiger* mutants are sensitive to extracellular pathogens. *PLoS Pathog.*, 3(3): 1–7.
- Scollard DM, Lathro PGW, Truman RW, 1996. Infection of distal peripheral nerves by *M. leprae* in infected armadillos: an experimental model of nerve involvement in leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, 64(2): 146–151.
- Silverman N, Maniatis T, 2001. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.*, 15(18): 2 321–2 342.
- Swaim LE, Connolly LE, Volkman HE, Humbert O, Born DE, Ramakrishnan L, 2006. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infect. Immun.*, 74(11): 6 108–6 117.
- Tanji T, Hu X, Weber AN, Ip YT, 2007. Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 27(12): 4 578–4 588.
- Valiathan RR, Resh MD, 2004. Expression of human immunodeficiency virus type 1 gag modulates ligand-induced downregulation of EGF receptor. *J. Virol.*, 78(22): 12 386–12 394.
- van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R, 2001. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N. Engl. J. Med.*, 345(19): 1 359–1 367.
- Zhu D, Jiang S, Luo X, 2005. Therapeutic effects of Ag85B and MPB64 DNA vaccines in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vaccine*, 23(37): 4 619–4 624.
- Zimmerli S, Edwards S, Ernst JD, 1996. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 15 (6): 760–770.

(责任编辑: 赵利辉)